

Genotyping of *Acanthamoeba* in Rural Drinking Water Sources in Kashan and Aran-Bidgol, Iran

Gholamreza Mostafaei¹,
Mansooreh Sabbaghian Bidgoli²,
Sima Rasti³,
Sayyed Gholamabbas Moosavi⁴,
Leila Iranshahi²

¹ Associate Professor, Department of Environmental Health, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

² MSc in Environmental Health, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

³ Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

⁴ MSc in Statistics, Faculty of Health, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received July 15, 2018 ; Accepted September 10, 2018)

Abstract

Background and purpose: *Acanthamoeba* spp. are an opportunistic protozoan in environmental sources that can cause respiratory infection and keratitis. The present study was conducted to determine the prevalence and genotypes of *Acanthamoeba* in rural drinking water sources in Kashan and Aran-Bidgol, Iran.

Materials and methods: In this study, 162 samples from 54 drinking water sources were collected in 2017. After samples filtration, they were cultured on non-nutrient agar to isolate free-living amoeba. After DNA extraction, the Polymerase Chain Reaction using JDP1, JDP2 primers was performed to detect *Acanthamoeba* spp. and finally the genotype of eight isolates was determined. Data analysis was done in SPSS applying Chi-square and Fisher's exact test.

Results: Among the samples 35.2% were found to be contaminated with free-living amoeba, among which 19 isolates (11.7%) were confirmed as *Acanthamoeba*. The rates of free-living amoeba and *Acanthamoeba* were 35.4% and 11.8%, respectively, in Kashan, which were higher than those in Aran-Bidgol. Frequency of free-living amoeba in Qanat, well, and spring was 55.6%, 30.2%, and 26.7%, respectively. *Acanthamoeba* contamination rates were 13.9%, 11.5% and 10%, respectively. *Acanthamoeba* contamination rate was higher in surface wells than that in deep wells. The genotype of all *Acanthamoeba* isolates belonged to T4.

Conclusion: This study revealed that drinking water sources were contaminated with free-living amoeba and *Acanthamoeba*. All isolates were T4 genotype, therefore, these sources could be considered as a risk factor for public health.

Keywords: free-living amoeba, *Acanthamoeba*, drinking water sources

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (169): 130-139 (Persian).

* Corresponding Author: Sima Rasti- Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
(E-mail: rasti_s@yahoo.com)

شناسایی و تعیین ژنوتایپ *آکانتامبا* در منابع آب آشامیدنی روستایی کاشان و آران بیدگل

غلامرضا مصطفایی^۱

منصوره صباغیان بیدگلی^۲

سیما راستی^۳

سید غلام عباس موسوی^۴

لیلا ایرانشاهی^۲

چکیده

سابقه و هدف: *آکانتامبا تک* یاخته فرصت طلبی که در طبیعت یافت می شود و قادر به ایجاد عفونت های تنفسی و کراتیت می باشد. این مطالعه با هدف بررسی آلودگی منابع آب آشامیدنی به ژنوتایپ های *آکانتامبا* در کاشان و آران-بیدگل انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۱۶۲ نمونه از ۵۴ منبع آب آشامیدنی، در سال ۱۳۹۶ جمع آوری و بعد از فیلتراسیون، روی آگار غیر مغذی کشت و از نظر آمیب های آزادی بررسی گردید. پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای JDP1 و JDP2، جهت شناسایی *آکانتامبا* انجام و ژنوتایپ ۸ ایزوله *آکانتامبا* تعیین شد. داده ها در نرم افزار SPSS با آزمون آماری کای دو و فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: ۳۵/۲ درصد نمونه ها آلوده به آمیب های آزادی بودند و ۱۹ مورد (۱۱/۷ درصد) *آکانتامبا* تأیید شد. میزان آلودگی به آمیب های آزادی و *آکانتامبا* در کاشان بیش تر از آران-بیدگل و به ترتیب ۳۵/۴ درصد و ۱۱/۸ درصد بود. میزان آلودگی به آمیب های آزادی در قنات، چاه و چشمه به ترتیب ۵۵/۶ درصد، ۳۰/۲ درصد و ۲۶/۷ درصد و آلودگی *آکانتامبا*، ۱۳/۹ درصد، ۱۱/۵ درصد و ۱۰ درصد تعیین شد. میزان آلودگی به *آکانتامبا* در چاه های سطحی بیشتر از عمیق بود. ژنوتایپ تمام ایزوله های *آکانتامبا* T4 تعیین شد.

استنتاج: نتایج نشان دهنده آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب های آزادی و *آکانتامبا* بود و با توجه به این که تمامی ژنوتایپ های شناسایی شده از نوع بیماری زای T4 بودند، این منابع می توانند به عنوان یک فاکتور خطر برای سلامت عمومی تلقی گردند.

واژه های کلیدی: آمیب های آزادی، *آکانتامبا*، منابع آب آشامیدنی

مقدمه

یاخته ها، باکتری ها و ویروس ها به انسان می باشد (۱).
آمیب های آزادی به خصوص جنس *آکانتامبا* علت اصلی آلودگی آب آشامیدنی به شمار می روند که به

یکی از اهداف مهم جوامع بشری دستیابی به توسعه و پیشرفت در سایه تأمین آب آشامیدنی سالم است. آب آلوده عامل انتقال بسیاری از عوامل بیماری زا نظیر تک

E-mail: rasti_s@yahoo.com

مؤلف مسئول: سیما راستی - کاشان: دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی

۱. دانشیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۴. کارشناسی ارشد آمار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۵/۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۱۹

چشمه) به آمیب آزادی آکانتامبا در شهرستان‌های کاشان و آران - بیدگل، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه مقطعی، ۱۶۲ نمونه از ۵۴ منبع تأمین آب آشامیدنی در روستاهای شهرستان‌های کاشان و آران - بیدگل به تفکیک ۶ منبع از آران-بیدگل (۶ چاه) و ۴۸ منبع از کاشان شامل (۱۰ چشمه، ۱۲ قنات و ۲۶ چاه) از فروردین تا شهریور ماه ۱۳۹۶ و طبق دستورالعمل نمونه برداری شرکت آب و فاضلاب روستایی و در ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری استریل شماره‌گذاری شده، جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد (۲۸).

جداسازی آمیب‌های آزادی

فیلتراسیون، کشت و پاساژ نمونه‌ها

نمونه‌های آب با استفاده از کاغذ نیترو سلولزی ۰/۴۵ میکرون Sartorius Stedim (شرکت بیوتک آلمان) و پمپ خلأ AEI (ساخت انگلستان) فیلتر شدند. فیلترها به طور وارونه روی محیط کشت نوترینت آگار غیر مغذی (NNA) (Non-Nutrient Agar) ۱/۵ درصد غنی شده با/شرشیاکلی قرار گرفته و در دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه انکوبه گردید (۶). از روز سوم پس از کشت، پلیت‌ها از نظر وجود تروفوزوئیت یا کیست آمیب با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. به علت دیر رشد بودن بعضی از سویه‌ها، پلیت‌ها حداکثر تا یک ماه نگهداری و در صورت عدم مشاهده آمیب، منفی در نظر گرفته شدند. به منظور به دست آوردن کشت خالص آکانتامبا، پلیت‌های حاوی اشکال کیستی پاساژ داده شدند و پس از سه بار شستشو، با سرم فیزیولوژی استریل و با دور ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرو لیتری استریل منتقل و در دمای ۲۰- درجه

و فور در طبیعت یافت شده و از فاضلاب، آب‌های سطحی، منابع آب شهری و روستایی، بطری‌های آب معدنی، خاک، گرد و غبار، محلول‌های شستشوی چشم و لنزهای تماسی جدا شده است (۶-۲). این تک یاخته دارای زندگی دوگانه بوده و در صورت فراهم بودن شرایط مساعد حالت انگلی پیدا می‌کند (۴). از طرفی این تک یاخته با برخی از باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا از قبیل لژیونلا، ویریکلرا، مایکوباکتریوم و هلیکوباکتریوم، آدنوویروس، کوکساکسی ویروس و اکو ویروس همزیستی داشته و تروفوزوئیت آن به عنوان مخزن این گروه از میکروارگانیسم‌ها شناخته شده است که سبب حفظ، تکثیر و انتقال آن‌ها می‌شود (۱۰-۷). این انگل به وسیله کیست یا تروفوزوئیت و از طریق آب، هوا، گرد و غبار و از راه بینی منتقل می‌گردد (۴). تاکنون ۲۰ ژنوتایپ آکانتامبا گزارش شده که اکثراً بیماری‌زا هستند و بیماری‌هایی از جمله آنسفالیت گرانولوماتوزی آمیبی، کراتیت آکانتامبایی، زخم‌های مزمن پوستی و عفونت دستگاه تنفسی فوقانی در افراد سالم و افراد دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد می‌کند (۱۵-۱۲). آمیب‌های آزادی و آکانتامبا از منابع آب آشامیدنی ترکیه، پاکستان، تایوان، الیزابت کوئین اوگاندا و همچنین از آب‌های راکد قزوین، رودخانه‌ها و آب‌های مناطق تفریحی تهران، چشمه‌های آب گرم اردبیل، منابع آب آشامیدنی اراک، شیراز، بیرجند و آذربایجان شرقی جدا شده است (۵-۱۶). با توجه به عدم تاثیر کلر بر روی کیست‌های آمیب و از آنجایی که آب استحصالی از منابع تأمین آب آشامیدنی، در نهایت به صورت لوله‌کشی در اختیار مصرف‌کننده قرار می‌گیرد، وجود آکانتامبا می‌تواند برای همه افراد خصوصاً برای افراد دارای نقص سیستم ایمنی، استفاده‌کنندگان از لنزهای تماسی، افراد مبتلا به بیماری‌های تنفسی و عفونت‌های چشمی و کودکانی که برای تفریح از این منابع استفاده می‌کنند، خطرناک باشد (۲۷). مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان آلودگی منابع آب آشامیدنی روستایی (چاه، قنات و

سانتی گراد جهت استخراج DNA نگهداری شد. برای شناسایی آمیب از نظر مورفولوژی، یک قطره از رسوب با میکروسکوب نوری با بزرگنمایی $40\times$ ، مورد بررسی قرار گرفت و با مشاهده تروفوزوئیت با پاهای کاذب سوزنی شکل و کیست با اندازه های ۱۵-۲۰ میکرو متر با دیواره چروکیده و یا ستاره ای شکل، آکانتامبا شناسایی شد (۵،۴).

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری DynaBio™ (تکاپوزیست ایران) و طبق دستورالعمل مربوط به آن، بر روی رسوب ۵۷ نمونه مثبت آمیب آزادی صورت گرفت. غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ و در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد.

تشخیص آکانتامبا با PCR

شناسایی و تأیید آکانتامبا از سایر آمیب های آزادی با استفاده از تکنیک PCR، پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا (JDP1 و JDP2) و مسترمیکس (تکاپوزیست ایران) انجام گرفت. این پرایمرها قادر به تکثیر قطعه ای از ژن 18S rRNA جنس آکانتامبا هستند (۲۲،۶). ترادف زوج پرایمرها جهت تکثیر ژنوم آکانتامبا در زیر آمده است.

Forward-JDP1: (5-GGCCAGATCGTTTACCGTGAA)
Reverse-JDP2: (5-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA)

واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) در حجم های ۲۰ میکرو لیتر و با دستگاه ترموسایکلر (Flex Cycler, Germany) به صورت، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۳ سیکل در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه، دمای آنیلینگ ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه

سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت. جهت بررسی نتایج PCR و اطمینان از تکثیر قطعه ژن مورد نظر، محصول PCR در کنار مارکر وزنی ۱۰۰bp روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز گردید. با مشاهده باند ۴۹۰bp در زیر دستگاه UV Transluminator، نمونه مثبت در نظر گرفته شد. PCR نمونه ها در کنار کنترل مثبت (نمونه استاندارد آکانتامبا تهیه شده از دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران) و کنترل منفی (آب دیونیزه به جای DNA) انجام گرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصول PCR (Sequencing)

محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 18SrRNA، ۸ ایزوله آکانتامبا جدا شده از منابع تأمین آب آشامیدنی، به شرکت تکاپوزیست (کره جنوبی)، ارسال و توالی نوکلئوتید آنها تعیین گردید. پس از بلاست کردن آنها در سایت NCBI و مقایسه با سایر ایزوله های جهان، ژنوتایپ های آکانتامبا شناسایی شد. داده ها در نرم افزار SPSS ثبت و با آزمون های آماری کای دو و فیشر تجزیه و تحلیل شدند و در $p \leq 0/05$ تفاوت از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

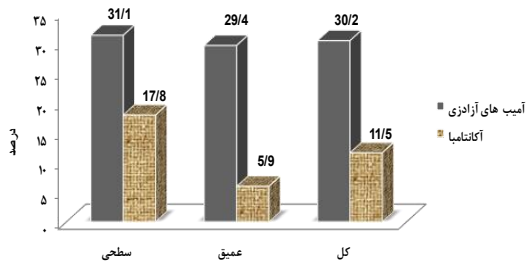
در مطالعه حاضر، ۱۶۲ نمونه از منابع آب آشامیدنی روستاهای شهرستان های کاشان و آران- بیدگل، به تفکیک ۱۴۴ نمونه از شهرستان کاشان و ۱۸ نمونه از شهرستان آران- بیدگل جمع آوری گردید. از ۱۶۲ نمونه مورد بررسی، ۵۷ نمونه (۳۵/۲ درصد) از نظر آمیب های آزادی مثبت بودند که با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس آکانتامبا، در ۱۹ ایزوله (۱۱/۷ درصد) باند حدود ۴۹۰ bp مشاهده و آکانتامبا تأیید شد (تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی آلودگی منابع آب آشامیدنی به

آمیب های آزادی بر حسب نوع منبع

| نوع منبع آب آشامیدنی | تعداد کل نمونه | آمیب های آزادی | | آکانتامبا | |
|----------------------|----------------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| | | مثبت | منفی | مثبت | منفی |
| قنات | ۳۶ | (۵۵/۶)۲۰ | (۴۴/۴)۱۶ | (۱۳/۹)۵ | (۸۶/۱)۳۱ |
| چاه | ۹۶ | (۳۰/۲)۲۹ | (۶۹/۸)۶۷ | (۱۱/۵)۱۱ | (۸۸/۵)۸۵ |
| چشمه | ۳۰ | (۲۶/۷)۳ | (۴/۳)۲۲ | (۱۰/۰)۳ | (۹۰/۰)۲۷ |
| جمع | ۱۶۲ | (۳۵/۲)۵۷ | (۶۶/۸)۱۰۵ | (۱۱/۷)۱۹ | (۸۸/۳)۱۴۳ |
| | | | | ۰/۰۱۴ | ۰/۰۸۸ |

P.value



نمودار شماره ۱: فراوانی آلودگی چاه های آب آشامیدنی به آمیب های آزادی و آکانتامبا بر حسب عمق چاه

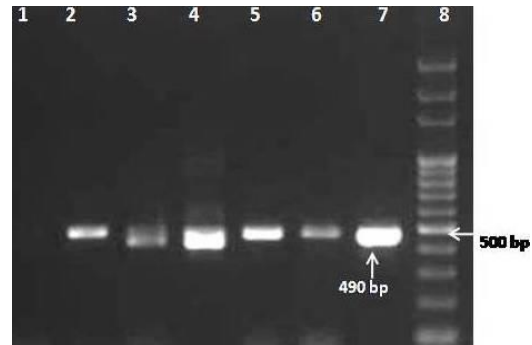
از ۱۹ ایزوله آکانتامبا، توالی نوکلئوتید ۸ ایزوله تعیین گردید و ژنوتایپ آن‌ها شناسایی شد. نتایج نشان داد ژنوتایپ تمام ایزوله‌ها، T4 و میزان تشابه آن‌ها با ایزوله‌های بانک ژن ۹۸-۱۰۰ درصد بوده است. ایزوله‌ها با جزییات کامل در بانک ژن ثبت گردید. شماره‌های ثبت ژن در جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول شماره ۳: شماره ثبت ژن ها در بانک ژن

| شماره ثبت | ژنوتایپ | منبع آب آشامیدنی |
|------------|---------|------------------|
| LC373012.1 | T4 | چشمه |
| LC373013.1 | T4 | چاه |
| LC374214.1 | T4 | چشمه |
| LC373015.1 | T4 | چاه |
| LC373014.1 | T4 | چاه |
| LC374217.1 | T4 | چاه |
| LC374215.1 | T4 | چاه |
| LC374216.1 | T4 | قنات |

بحث

در مطالعه حاضر میزان آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب های آزادی و آکانتامبا با روش های کشت و PCR در روستاهای شهرستان های کاشان و آران-بیدگل مورد بررسی قرار گرفت. میزان آلودگی به آمیب های



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR آکانتامبا با استفاده از پرایمر های JDP1 و JDP2 بر روی ژل ۱/۵ درصد

در تصویر شماره ۱، ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ کنترل مثبت آکانتامبا، ستون ۳ نمونه مثبت آکانتامبا در قنات، ستون ۴ نمونه مثبت در چشمه و ستون های ۵ و ۶ و ۷ نمونه های مثبت در چاه و ستون ۸ مارکر وزنی ۸۰۰ bp می باشد. توزیع فراوانی آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب های آزادی و آکانتامبا در شهرستان های کاشان و آران-بیدگل در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی آلودگی منابع آب آشامیدنی به آمیب های آزادی و آکانتامبا در کاشان و آران-بیدگل

| شهرستان | آمیب های آزادی | | آکانتامبا | |
|------------|----------------|-----------|---------------|----------------|
| | مثبت | منفی | مثبت | منفی |
| کاشان | (۳۵/۴)۵۱ | (۶۴/۶)۹۳ | (۱۱/۸)۱۷ | (۸۸/۲)۱۱۷ |
| آران-بیدگل | (۳۳/۳)۶ | (۶۶/۷)۱۲ | (۱۱/۱)۲ | (۸۸/۹)۱۶ |
| جمع | (۳۵/۲)۵۷ | (۶۶/۸)۱۰۵ | (۱۱/۷)۱۹ | (۸۸/۳)۱۴۳ |
| | | | ۱ | ۰/۰۸۶ |
| | | | ۰/۰۶۷۵-۰/۱۶۶۵ | ۰/۰۴۲۵۵-۰/۱۷۸۵ |

میزان آلودگی آب به آمیب های آزادی در قنات، چاه و چشمه به ترتیب ۵۵/۶ درصد، ۳۰/۲ درصد و ۲۶/۷ درصد (p = ۰/۰۱۴) و میزان آلودگی به آکانتامبا، ۱۳/۹ درصد، ۱۱/۵ درصد و ۱۰ درصد (p = ۰/۰۸۸) تعیین گردید (جدول شماره ۲).

میزان آلودگی به آمیب های آزادی و آکانتامبا در آب چاه های سطحی به ترتیب ۳۱/۱ درصد و ۱۷/۸ درصد و در چاه های عمیق به ترتیب ۲۹/۴ درصد و ۵/۹ درصد بوده است (نمودار شماره ۱).

جغرافیایی و شرایط آب و هوایی مشابه در این دو شهرستان باشد.

در مطالعه حاضر میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی در قنات، چاه و چشمه از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p=0/014$) و بیش‌ترین میزان آلودگی در قنات (۵۵/۶ درصد) مشاهده شد. از نظر میزان آلودگی به *آکانتامبا* در این منابع تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/88$). قنات‌ها به علت سطحی بودن و داشتن راه‌های تماس بیش‌تر با محیط و منابع خاکی همچنین دسترسی کشاورزان و دامداران به آن‌ها دارای آلودگی بیش‌تری نسبت به سایر منابع می‌باشند.

در مطالعه مسیبی و همکاران (۲۰۱۴) روی منابع آب روستایی اراک میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی ۶۱/۱ درصد و میزان آلودگی به *آکانتامبا* در آب قنات، چشمه و چاه به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۸۰ درصد و ۶۶/۶ درصد گزارش شد که از نتایج مطالعه حاضر بیش‌تر بود. احتمالاً علت این تفاوت، استفاده از روش مورفولوژیکی در تشخیص *آکانتامبا* در مطالعه فوق می‌باشد که از دقت کم‌تری نسبت به روش مولکولی برخوردار است. همچنین بیش‌ترین میزان آلودگی در آب قنات مشاهده شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشته است (۵). در مطالعه قدر قدر (۲۰۱۲) روی منابع آب شیراز، چاه‌ها به عنوان آلوده‌ترین منابع به *آکانتامبا* (۴۴/۴ درصد) شناسایی شدند که با مطالعه حاضر همخوانی نداشته است (۲۴).

در مطالعه ای که بهنیاfer و همکاران (۲۰۱۵) روی منابع آبی (چشمه‌های آب سرد و گرم، چاه‌های خانگی، رودخانه و آب لوله‌کشی) در آذربایجان شرقی انجام دادند، میزان آلودگی به *آکانتامبا* با دو روش کشت و PCR، ۲۵/۴ درصد گزارش شد. همچنین میزان آلودگی به *آکانتامبا* در چشمه‌های آب سرد، آب لوله‌کشی و چاه‌ها به ترتیب ۱۷/۲ درصد، ۳۷/۵ درصد و ۳۳/۳ درصد گزارش شد که نسبت به نتایج مطالعه حاضر بیش‌تر بوده است (۲۶). براساس نتایج مطالعه خضری و همکاران (۲۰۱۶) بر روی منابع آبی مختلف (زیرنه رود، سیمینه

آزادزی ۳۵/۲ درصد ($CI=0/2785-0/4255$) و *آکانتامبا* ۱۱/۷ درصد ($CI=0/0675-0/1665$) بوده است.

در مطالعه قدر قدر و همکاران (۲۰۱۲) روی منابع آب آشامیدنی شیراز و مطالعه نیتی و همکاران روی منابع آب کیش (۲۰۱۵) میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی به ترتیب ۳۵ درصد و ۳۸/۲ درصد گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشته است. همچنین میزان آلودگی به *آکانتامبا* ۳۲/۵ درصد و ۲۹/۱ تایید شد که از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بیش‌تر بوده است (۲۹،۲۴).

در مطالعه گلستانی و همکاران (۲۰۱۸) بر روی آب میدین و پارک‌های کاشان و مطالعه فرجی و همکاران (۲۰۱۶) روی آب استخرها و حوضچه‌های میدین خرم آباد میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی به ترتیب ۸۵/۷ درصد و ۵۹/۵ درصد و میزان آلودگی به *آکانتامبا* به ترتیب ۵۹/۴ درصد و ۴۱/۷ درصد گزارش شده است که نسبت به بررسی حاضر بیش‌تر بوده است که می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع منابع مورد بررسی و تماس بیش‌تر آن‌ها با آلودگی‌های محیطی و گرد و غبار در این دو مطالعه می‌باشد (۳۱،۳۰).

در مطالعه Montalbano Di Filippo و همکاران (۲۰۱۵) روی آب لوله‌کشی در ایتالیا و مطالعه Coskun و همکاران (۲۰۱۳) روی آب لوله‌کشی در سیواس ترکیه میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی به ترتیب ۱۷/۸ درصد و ۲۲ درصد و میزان آلودگی به *آکانتامبا* در این مطالعات به ترتیب ۴/۸ درصد و ۵/۳ درصد گزارش گردید که نسبت به مطالعه کنونی آلودگی کم‌تری نشان دادند (۳۲،۱۶). علت این تفاوت، استفاده از آب لوله‌کشی و عدم ورود آلودگی‌های محیطی به آب در این دو مطالعه می‌باشد. در بررسی حاضر میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و *آکانتامبا* در منابع آب آشامیدنی روستاهای شهرستان کاشان و آران بیدگل تقریباً مشابه بود و تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد ($p=0/86$). این تشابه می‌تواند به دلیل همجواری و داشتن موقعیت

خضری (۲۰۱۶) در شمال غرب ایران T4 و T5، Magnet (۲۰۱۳) در اسپانیا Sent T4 (۲۰۱۶) در اوگاندا T1، T2، T4، T5، T6 و T11 و Kao (۲۰۱۵) در تایوان ژنوتایپ‌های T2 و T4 را در منابع آبی مختلف و غمی لویی (۲۰۱۴) ژنوتایپ T4 را از زخم‌های چشمی بیماران در بیمارستان فارابی تهران شناسایی کردند که در همه این مطالعات ژنوتایپ T4 به عنوان ژنوتایپ غالب گزارش شده است که با مطالعه حاضر مطابقت داشت (۱۸، ۱۹، ۲۶، ۳۰، ۳۱، ۳۳، ۳۶، ۳۷). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، میزان آلودگی به آکانتامبا در منابع آب شرب روستاهای شهرستان‌های آران-بیدگل نسبت به بسیاری از مطالعات مشابه در ایران، کمتر بود اما از آنجا که ژنوتایپ آکانتامبا در این مطالعه از نوع T4 بوده است و با توجه به بیماری‌زا بودن این ژنوتایپ و به خصوص نقش آن در بروز کراتیت آمیبی و آنسفالیت گرانولوماتوزی آمیبی، منابع آلوده می‌توانند به عنوان یک خطر بالقوه برای ایجاد این گونه از بیماری‌ها محسوب گردد، از این رو بهسازی منابع، حفظ میزان کلر باقیمانده مناسب در مخازن و شبکه‌های توزیع آب آشامیدنی و آموزش بهداشت جهت کنترل و پیشگیری از آلودگی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان به خاطر حمایت (طرح پژوهشی ۹۶۴۴، کد اخلاق مقاله: IR.kaums.NUHEPM.REC.1396.1 و تاریخ کمیته اخلاق: 22.3.1396) و از همکاری مسئولین محترم گروه انگل شناسی و گروه بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کاشان قدردانی می‌گردد.

References

1. Ghaderpoori M, Dehghani MH, Fazlzadeh M, Zarei A. Survey of microbialality of drinking

رود و آب لوله کشی) در شمال غربی ایران، میزان آلودگی به آکانتامبا در آب رودخانه ۴۵ درصد و در آب لوله کشی آلودگی مشاهده نشد (۳۳).

در مطالعه Leiva و همکاران (۲۰۰۸) روی منابع مختلف آب نیکاراگوئه، میزان شیوع آمیب‌های آزادزی در آب چاه‌ها و چشمه‌ها به ترتیب ۵۷ و ۷۵ درصد و میزان شیوع آکانتامبا ۱۹ و ۲۱ درصد بود که نسبت به مطالعه حاضر بیشتر بوده است (۳۴). در مطالعه Kuk و همکاران (۲۰۱۳) روی آب چاه‌ها در کایسری ترکیه میزان آلودگی به آکانتامبا با دو روش کشت و PCR، ۱۹/۲ درصد گزارش شد که نسبت به مطالعه کنونی آلودگی بیش تری نشان داد (۳۵).

در مطالعه حاضر میزان آلودگی به آمیب‌های آزادزی و آکانتامبا در چاه‌های سطحی بیش تر از عمیق بوده است، اما تفاوت آن از لحاظ آماری معنی دار نبود (به ترتیب $P=0/856$ و $p=0/068$). چاه‌های سطحی به دلیل قطر زیاد دهانه آن‌ها (حداقل ۱ متر و ۲۰ سانتی‌متر) به علت حفاری دستی و احتمال انتقال خاک و آلودگی در اثر طوفان، رفت و آمد، بازدید و تعمیرات، آلودگی بیشتری نسبت به چاه‌های عمیق دارند. تاکنون ۲۰ ژنوتایپ مختلف آکانتامبا (T1-T20) شناسایی گردید و اغلب ژنوتایپ‌های آکانتامبا جدا شده از محیط و نمونه‌های کلینیکی، T4 و از نظر مرفولوژیکی در گروه دوم (II) قرار دارند. ژنوتایپ‌های T4، T3 و T5 علاوه بر شیوع بیش تر، نقش مهم تری در بروز بیماری‌ها ایفا می‌کنند (۲، ۱۱، ۳۱).

در مطالعه حاضر نیز ژنوتایپ ۸ ایزوله آکانتامبا، T4 بود. بهنیافر (۲۰۱۵) در آذربایجان شرقی T5، T4، T3 و T13، گلستانی (۲۰۱۸) در کاشان ژنوتایپ‌های T2، T4، T5، T7 و T11، فرجی (۲۰۱۷) در خرم آباد T4،

water in rural areas of Saqqez, Iran. Am-Euras J Agric Environ Sci 2009; 5(5): 627-632.

2. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50(1): 1-26.
3. Teixeira LH, Rocha S, Pinto RM, Caseiro MM, Costa SO. Prevalence of Potentially free living amoeba from *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in nonhospital, public .internal environment from the city of Santos, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2009; 13(6): 295-297.
4. Edrisiyan G, Rezaeian M, Mohebal M, Keshavarz H. *Medical Protozoology*. 1st ed. Tehran: University of Medical Sciences; 2008 (Persian).
5. Mosayebi M, Ghorbanzadeh B, Eslamirad Z, Ejtehadifar M, Rastad B. The Isolation and Detection of *Acanthamoeba* in Rural Water Sources of Arak, Iran. *Med Lab J (MLJ)* 2014; 7(4): 66-71 (Persian).
6. Niyayati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebal M, Maghsood AH, et al. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp Parasitol* 2009; 121(3): 242-245.
7. Rezaian M, Hooshyar H. A Review of Medical important of free living-amoebas. *J Med Council I.R. Iran* 2011; 29(1): 69-83 (Persian).
8. Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* 2012; 60(6): 399-405.
9. Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a drinking water treatment plant . *Environ Microbiol* 2008; 10(10): 2728-2745.
10. Khan NA. pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microb Pathog* 2003; 34(6): 277-285.
11. Behera HS, Panda A, Satpathy G, Bandivadekar P, Vanathi M, Agarwal T, et al. Genotyping of *Acanthamoeba* spp. And characterization of the prevalent T4 type along with T10 and unassigned genotypes from amoebic keratitis patients in India. *J Med Microbiol* 2016; 65(5): 370-376.
12. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp .as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2): 273-307.
13. Rezaeiaan M, FarniaSh, Niyayati M, Rahimi F. Amoebic keratitis in Iran (1997-2007). *Iran J Parasitol* 2007; 2(3): 1-6.
14. Rasti S, Hooshyar H, Arbabi M .*Text Book of Medical Parasitology*. Morsal Poblication; 2017. (Persian)
15. Fuerst PA, Booton GC, Crary M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18SrRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol* 2015; 62(1): 69-84.
16. Coskun KA, Ozcelik S, Tutar L, Elaldi N, Tutar Y. Isolation and Identification of Free Living Amoebae form Tap water in Sivas, Turkey. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 675145.
17. Yousuf FA, Sddiqui R, Subhani F, Khan NA. Status of free living amoebae (*Acanthamoeba* spp, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. *J Water Health* 2013; 11(2): 373-375.
18. Kao PM, Hsu BM, Hsu TK, Liu JH, Chang HY, Ji WT. Seasonal distribution of potentially pathogenic *Acanthamoeba* species from drinking water reservoirs in Taiwan. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22(5): 3766-3773.

19. Sente C, Erume J, Naigaga I, Kimuda Magambo Ph, Mulindva J, chvo S, et al. Prevalence of pathogenic free-living amoeba and other protozoa in natural and communal piped tap water from Queen Elizabeth protected area, Uganda. *Parasit Vect* 2016; 9: 1-8.
20. Hooshyar H, Hosseinbigi B, Saraei M, Alizadeh S, Eftekhar M, Rasti S, et al. Genotyping of Acanthamoeba Isolated From Surface and Stagnant Waters of Qazvin, Central Iran. *Iran Red Crescent Med J* 2013; 15(6): 536-538.
21. Nazar M, Haghhighian A, Niyyati M, Eftekhar M, Tahvildar-Biderouni F, Taghipour N, et al. Genotyping of Acanthamoeba isolated from water in recreational areas of Tehran, Iran. *J Water Health* 2011; 9(3): 603-608.
22. Niyyati M, Lasjerdi Z, Nazar M, Haghghi A, Nazemalhosseini Mojarad E. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *J Water Health* 2012; 10(1): 140-146.
23. Niyyati M, Babaei Z, Amini H, Badirzadeh H, Badirzadeh A, Rezaeian M. Isolation of Free-Living Amoebae from Sarein Hot Springs in Ardebil Province, Iran. *Iran J Parasitol* 2011; 6(2): 1-8.
24. Ghadar-ghadr Sh, Solhjoo K, Norouz nejad MJ. Isolation and identification of free living amoeba (Nagleria and Acanthamoeb) in Shiraz water resources by morphological criteria. *J Jahrom Univ Med Sci* 2012; 10(3): 33-41 (Persian).
25. Behravan M, Malekaneh M, Mesbahzadeh M, Sharifzadeh G, Namaei MH, Behnia Far H, et al. Microscopic Isolation and Characterization of Free Living Amoebae from Surface in Birjand, the Capital city of the South Khorasan. *J of Birjand Univ Med Sci* 2015; 22(2): 161-168 (Persian).
26. Behniafar H, Niyyati M, Lasjerdi Z. Molecular Characterization of Pathogenic Acanthamoeba Isolated from Drinking and Recreational water in East Azerbaijan, Northwest Iran. *Environ Health Insights* 2015; 9: 7-12.
27. Bergmanson JP, Wang E, Gire AL, Osato MS. In vitro effects of medium tonicity, nutrient concentration, and free chlorine content on Acanthamoeba. *Cont Lens Anterior Eye* 2011; 34(4): 164-168.
28. Instructions for microbiological sampling, National Water and Waste Water Engineering Company. Water and Waste Water Company of Isfahan province. Document Code: L-W-507-503 (Persian).
29. Niyyati M, Lasjerdi Z, Jacob L. Detection and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic Free-living Amoebae from Water Sources in Kish Island, Southern Iran. *SAGA J* 2015; 8(Suppl1): 1-6.
30. Golestani MH, Rasti S, Hooshyar H, Delavari M, Mousavi SGA, et al. Molecular Identification and Genotyping of Acanthamoeba Isolated from Environmental Sources in Kashan, Central Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2018; 11(4): e55582.
31. Faraji M, Maghsood AH, Fallahi Sh, Chegeni A, Karimi A, Lasjerdi Z, Fallah M. Frequency and Genotyping of Acanthamoeba Species in the Swimming Pools and Ponds of Khoramabad, Iran, in 2016. *Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2017; 24(3): 236-243 (Persian).
32. Montalbano Di Filippo M, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, et al. Isolation and Molecular Characterization of Free-Living Amoebae from Different

- Water Sources in Italy. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12(4): 3417-3427.
33. Khezri A, Fallah E, Mostafazadeh M, Spotin A, Shahbazi A, Mahami-Oskouei M, et al. Molecular and Morphometric Characterization of *Acanthamoeba* spp. from different Water Sources of Northwest Iran as a Neglected Focus, Co-Bordered With the Country of Iraq. *Jundishapur J Microbiol* 2016; 9(11): e38481.
34. Leiva B, Clasdotter E, Linder E, Winiecka-Krusnell J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. Amebae in water sources of León, Nicaragua. *Rev Biol Trop* 2008; 56(2): 439-446.
35. Kuk S, Yazar S, Dogan S, Çetinkaya Ü, Sakalar Ç. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated from Kayseri well water. *Turk J Med Sci* 2013; 43(1): 12-17.
36. Magnet A, Fenoy S, Galván AL, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, et al. A yearlong study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Res* 2013; 7(19): 6966-6972.
37. Ghamilouie MM, Valadkhani Z, Rahimi F, Khoshzaban F, Aghighi Z, Hassan N. Isolation and Genotyping of *Acanthamoeba* Strains from Corneal Scraps. *Iran J Ophthalm (IrJO)* 2014; 26 (2): 97-101.